



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# **Kortisol som stressindikator hos hund**

## ***Icke invasiva provtagningsmetoder***

*Lina Welanders*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:15

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Kortisol som stressindikator hos hund Icke invasiva provtagningsmetoder**

Cortisol as stress indicator in dogs

Non-invasive sampling methods

*Lina Welander*

### **Handledare:**

Katja Höglund och Josefin Söder, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

### **Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2013

**Omslagsbild:** Lina Welander

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:15  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Kortisol, stress, hund, mätmetod, välfärd

**Key words:** Cortisol, stress, dog, measurement, welfare



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturstudie .....	3
Litteraturöversikt.....	3
Allmänt om kortisol .....	3
Reglering och produktion.....	3
Funktion och metabolism .....	2
Dygnsvariation .....	3
Fysiologisk variation .....	3
Stressindikatorer.....	3
Vad är stress? .....	3
Stressindikatorer .....	4
Kortisol.....	4
Icke-invasiva provtagningsmetoder för kortisol .....	5
Saliv.....	5
Urin.....	7
Faeces .....	8
Diskussion .....	9
Slutsats .....	12
Litteraturförteckning .....	12

## **SAMMANFATTNING**

Långvarig stress ger hos djur precis som hos människor psykisk och fysisk ohälsa. Upptäckt och bedömning av stress är därför av stor vikt. Det finns flera stressindikatorer som förhöjd hjärtfrekvens och stressbeteenden men kortisol anses idag vara huvudindikatorn.

Kortisol är involverat i immunförsvaret, stressvaret och energiregleringen. Frisättning stimuleras av exempelvis fysisk aktivitet, födointag och stress. Hos hund varierar kortisolnivån med fysiologiska parametrar som ras, ålder och eventuellt kön, men saknar en tydlig dygnsrytm.

Stressvaret varierar mellan individer och efter typ av stresstimuli. Även normala kortisolkoncentrationer varierar mycket inom- och mellan individer. Man bör därför utgå från ett fastställt basalvärde, gärna genom att individen fungerar som sin egen kontroll. Ett oförändrat kortisolvärde kan inte utesluta stress men ett förhöjt värde är en stark indikation, speciellt vid komplettering av ytterligare stressindikatorer.

Kortisol kan analyseras i kroppsvätskor och faeces. Blod och saliv innehåller kortisol medan urin och faeces innehåller speciesspecifika kortisolmetaboliter. Hanteringen av djuret vid blodprovstagning utgör ofta en stressfaktor varför icke-invasiva provtagningsmetoder med minimal hantering anses som bra alternativ. En hastig kortisolkoncentrationsökning vid akut stress reflekteras väl i saliv då fritt kortisol snabbt diffunderar till spottkörtlarna. Urin och faeces speglar bättre en tids kortisolfrisättning, och därmed kronisk stress, då en viss tid löper mellan kortisolfrisättning till blod och utsöndring i njurar respektive galla. Tid och frekvens för provtagning av saliv är mer påverkbart än för urin och faeces, de sistnämnda är däremot hanteringsfria till skillnad från salivprovtagning. Många faktorer kan påverka ett analysresultat såsom provtagnings- och analysmetod, provtagningsredskap och kontaminerande faktorer.

## **SUMMARY**

Prolonged stress can cause mental and physical illness in animals as well as in humans. Detection and assessment of stress is thus of great importance. There are several stress indicators such as increased heart rate and stress behaviours, but cortisol is considered the main indicator.

Cortisol is important for the immune function, stress response and energy regulation. Secretion is stimulated by many factors such as physical activity, food intake and stress. In dogs cortisol secretion varies with physiological parameters such as breed, age and possibly gender, but lacks a clear circadian rhythm.

Stress response varies between individuals, and by type of stress stimuli. Normal cortisol concentrations also vary widely within- and between individuals. Assessment should therefore be based on a determined basal value. It is desirable that individuals serve as their own controls. An unchanged cortisol value cannot exclude stress. An elevated value is however a strong indication particularly combined with additional stress indicators.

Cortisol can be analysed in body fluids and faeces. Blood and saliva contains cortisol, while urine and faeces mainly contain species-specific cortisol metabolites. The handling needed for blood sampling often cause stress. Non-invasive sampling methods with minimal handling are therefore considered good alternatives. Acute stress causes rapid increase in cortisol concentration. This is well reflected in saliva as free cortisol rapidly diffuses to the salivary glands. Some time passes between cortisol secretion into blood and elimination in urine and faeces. These excretions therefore better reflect cortisol secretion during a period of time, or chronic stress. Urine and faeces sampling does not require handling unlike saliva sampling. Time point and frequency of sampling is however easier to control for saliva. Many factors can affect analysis results such as sampling- and analytical method, sampling tools and contaminating factors.

## INLEDNING

Kortisol är en sedan länge välkänd indikator för stress. En fysisk eller psykisk situation som djuret uppfattar stressande yttrar sig genom bland annat förhöjda kortisolnivåer. Även sympatikuspåslag med adrenalinförsättning, förhöjd hjärtfrekvens samt olika stressbeteenden ses vid stress, och anses som bra komplement till kortisol vid utvärdering av stress.

Ett djur kan bli stressat om det hålls dåligt. Bra djurhållning och avsaknad av stress är avgörande för god djurvälstånd. Kortisol är en viktig faktor i utvärdering och upptäckt av dålig djurvälstånd. Medvetenheten kring djurvälstånd ökar liksom kunskaper gällande prevention, åtgärd och upptäckt. Studier där kortisolmätning ingår är en del av den utvecklingen.

Mätning av kortisol i plasma/serum är förenat med risken att djuret stressas av situationen och hanteringen vid blodprovstagning. Provresultatet kan därmed ge en skev bild av djurets faktiska stressstillstånd. Blodprovstagning kräver även utbildad och tränad personal. Detta arbete avser ta upp icke-invasiva provtagningsmetoder för mätning av kortisol, med fokus på hund. Metodernas för- och nackdelar går igenom, liksom andra faktorer som kan påverka tolkningen av kortisolvärdena.

## MATERIAL OCH METODER

### Litteraturstudie

Vid litteratursökning användes SLU-bibliotekets söktjänst *Primo* samt databaserna *PubMed*, *Scopus* och *Web of Knowledge*. De flesta artiklar hittades via litteraturförteckningar varifrån rubriker användes för sökning i *Google Scholar*.

Följande sökord användes:

- dog OR canine
- cortisol
- stress OR "stress indicator" OR "indicator of stress"
- measurement
- method

Begränsningar utgjorde de artiklar, skrivna på svenska eller engelska, som kunde nås via SLUs VPN anslutning.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Allmänt om kortisol

#### *Reglering och produktion*

Glukokortikoider (steroidhormoner) av vilka kortisol anses viktigast på hund, produceras i binjurebarkens mittzon huvudsakligen efter stimulering av adrenokortikotropt hormon



(ACTH) från hypofysen. ACTH frisätts när hypofysen stimuleras av kortikotropinfrisättande hormon (CRH) producerat av neuroner i paraventriculära kärnor i hypotalamus i hjärnan vid exempelvis stress (Feldman & Nelson, 2004). Kortisol hämmar ACTH- och CRH frisättningen genom "negativ feedback". Även ACTH utövar "negativ feedback" på CRH frisättningen. Det nyss beskrivna anges ofta i litteraturen som hypotalamus-hypofys-binjure-axeln (HPA-axeln). De kortisolproducerande cellerna lagrar inte hormon varför kortisol utsöndras till blodet direkt efter produktion (Rijnberk & Kooistra, 2010).

Regleringen av kortisol är komplex och frisättning stimuleras av exempelvis födointag och aktivitet. På senare tid har man sett att fler faktorer påverkar som neurotransmittorer, cytokiner och tillväxtfaktorer liksom parakrin verkan inom binjurebarken (Rijnberk & Kooistra, 2010).

Stress ger ökad kortisolfrisättning. Under långvarig stress ökar binjurebarkens tjocklek på grund av ihållande hög ACTH-nivå i plasma vilket bibehåller förhöjd kortisolfrisättning (Sjaastad et al, 2010), som på sikt kan ge allvarliga bieffekter.

### ***Funktion och metabolism***

Kortisol är en fettlöslig molekyl som fritt kan diffundera över cellmembran. I blodet transporteras kortisol bundet till framför allt kortisolbindande globulin (CBG) (Sjaastad et al, 2010) men även till erythrocyter och albumin (Rijnberk & Kooistra, 2010). Endast den fria fraktionen är biologiskt aktiv men bestämmer tillsammans med den bundna fraktionen vävnadernas tillgänglighet på kortisol då det råder en jämvikt mellan fraktionerna (Rijnberk & Kooistra, 2010). Från blodet kan kortisol filtreras i njurarna och utsöndras via urinen men inaktivering sker generellt i levern till en mer vattenlöslig förening som kan utsöndras via gallan och vidare ut i faeces (Harvey & Ferrier, 2011).

Kortisol verkar på kroppens alla celler via intracellulära receptorer. Kortisol bundet till receptorn tar sig från cytosolen till cellkärnan och stimulerar och/eller inhiberar uttrycket av flera olika gener (Sjaastad et al, 2010).

Kortisol medverkar i stressvaret, immunförsvaret, regleringen av energi med mera. Nedan punktas kortisolets huvudfunktioner samt bieffekter av långvarigt förhöjda kortisolnivåer:

- Utan kortisol fungerar vare sig katekolaminers vasokonstriktiva verkan eller glukagons svar på lågt blodsocker. Kortisol behövs således för reglering av blodtryck samt vid hypoglykemi (Sjaastad et al, 2010).
- Vid stress ger kortisol kroppen höjt försvar såsom ökad energitillgång:
  - Blodglukoshalten ökar genom stimulering av glukoneogenesen samt inhibering av glukosupptaget i vissa vävnader (därav namnet glukokortikoid).
  - Fettsyror och aminosyror görs åtkomliga via nedbrytning av fett och protein (Sjaastad et al, 2010).

- Långvarigt förhöjda kortisolnivåer verkar i extremfall tillväxthämmande genom inhibering av DNA syntesen samt genom proteinnedbrytning (Sjaastad et al, 2010).
- Kortisol är immunsupprimerande och antiinflammatoriskt. Bland annat hämmas inflammatoriska cellers migration från blodomloppet till platsen för skada. Detta kan vara positivt, som vid kraftiga allergiska reaktioner där kortisol kan ges exogent, men även negativt på lång sikt, speciellt för infektionskänsliga individer.
- Långvarigt förhöjda kortisolnivåer hämmar i längden fibroblaster vilket leder till förtunning av huden, dålig sårhäkning samt uppkomst av blåmärken.
- Benmassan påverkas negativt. Kortisol hämmar osteoblaster men stimulerar osteoklaster samt reducerar tarmens kalciumupptag från födan. Låga plasmanivåer av kalcium stimulerar parathormon- (PTH) frisättning från sköldkörteln varpå kalcium rekryteras från ben (Feldman & Nelson, 2004), vilket påverkar benmassan ytterligare.
- Hundar får polydipsi och polyuri vid kronisk höga kortisolnivåer genom negativ påverkan på anti-diuretiskt-hormon (ADH) (Feldman & Nelson, 2004).

### ***Dygnsvariation***

Till skillnad från människor, är många däggdjurs dygnsrytm av ACTH- och kortisolfrisättning inte särskilt uttalad. Lite finns dokumenterat om en eventuellt existerande dygnsrytm av ACTH frisättning hos hund (Sjaastad et al, 2010; Feldman & Nelson, 2004). En möjlig dygnsrytm hos hund kan motbevisas av att man inte sett en ökning av den episodiska ACTH frisättningen under morgonen som man sett i människors saliv och plasma (Rijnberk & Kooistra, 2010). Torrance och Mooney (1998) skriver att kortisolfrisättning hos hund följer ett ” slumpmässigt episodiskt mönster” som inte kan förutses. Beerda et al (1996) såg ingen dygnsvariation av kortisol i plasma under sitt försök.

### ***Fysiologisk variation***

Reimers et al (1990) fann att basala serumkortisolkoncentrationer var högre hos små raser än hos stora raser och lägre hos diande valpar än hos äldre hundar. De såg ingen skillnad mellan könen. En annan studie fann också högre basala och stressinducerade kortisol- och ACTH-koncentrationer i plasma hos äldre hundar än yngre. Det tog lika lång tid oavsett ålder för hundar att återfå basalnivå efter stress varav den negativa feedbacken inte verkar förändras med åldern. Ålderseffekten tror man beror på en förändring av antalet kortisolreceptorer i hjärnan (Reul, Rothuizen & de Kloet, 1991).

Beerda et al (1999) såg tecken på att tikar kan vara känsligare än hanhundar för akut- men även kronisk stress orsakad av dålig djurhållning.

### **Stressindikatorer**

#### ***Vad är stress?***

Begreppet stress har många definitioner. Sjaastad et al (2010) nämner stress i betydelsen av förändring av, eller hot mot, kroppens homeostas och att både externa faktorer som kyla samt interna faktorer som psykisk ohälsa kan bidra till stress. Man kan uppleva stress både

långvarigt (kronisk stress) och kortvarigt (akut stress). Möstli och Palme (2002) skriver att den vanligaste betydelsen av ett stresstimuli är ett miljöbetingat stimuli som ger rubbad homeostas och att ett stressvar är kroppens svar på detta. Ett stressvar är inte bara negativt utan nödvändigt i flera situationer som flykt.

Stressvaret kan skilja sig mellan individer. Man har sett att gevärsljud gav ökning av plasmakortisolnivåer endast hos skotträdda hundar (Hydbring-Sandberg et al, 2004). Stressvaret kan även skilja sig åt mellan olika djurarter (Rijnberk & Kooistra, 2010).

### ***Stressindikatorer***

Även om reaktionen på olika stresstimuli kan te sig olika reagerar kroppen enhetligt i vissa avseenden, bland annat genom ökad hjärtfrekvens och frisättning av steroidhormoner som adrenalin och kortisol. Kortisol anses vara huvudindikatorn för stress (Kirschbaum & Hellhammer, 1989) men många studier har gjorts på de andra indikatorerna.

Hos tio hundar som utsattes för olika akuta stresstimuli fann man ingen korrelation mellan fysiologiska stressindikatorer (hjärtfrekvens och salivkortisol) och beteende. Man såg ökad förekomst av låg kroppshållning, skakningar med mera som kan tyda på stress men beteendeparmetrar ansågs lätta att misstolka då beteenden kan variera mycket efter typ av stresstimuli och individkaraktäristika (Beerda et al, 1998). Misstolkning kan även ske då man sett att olika levnadsförhållanden gett olika beteenden samt att stressade hundar inte alltid visar avvikande beteenden. Vissa beteenden utförs också utan att stress föreligger (Beerda et al, 1999; Beerda et al, 2000).

Ökad hjärtfrekvens kan vara resultat av både en negativ och en positiv upplevelse och är därmed svårtolkat i samband med akut stress (Beerda et al, 1998).

### ***Kortisol***

Ökad kortisolfrisättning kan överrösta den negativa feedbacken på HPA-axeln varvid förhöjda kortisolnivåer kan detekteras. Mängden utsöndrat kortisol samt tiden till maxkoncentration verkar bero på grad och typ av stress (Kirschbaum & Hellhammer, 1989).

Hos de flesta arter har man detekterat kortisol i saliven. Urin och faeces har däremot innehållit framför allt metaboliter av kortisol. Metaboliterna är artspecifika och utsöndras övervägande via faeces eller via urin (Queyras & Carosi, 2004). Hund utsöndrar metaboliserat kortisol huvudsakligen via njurarna (urinen) i glukuroniderad form medan kattens utsöndring sker övervägande via gallan (faeces) i sulfaterad form (Rijnberk & Kooistra, 2010; Schatz & Palme, 2001).

Basala kortisolvärden mäts med fördel i hundars hemmiljö och ska reflektera den dagliga rytmen med vardagliga stresstimuli såsom aktiviteter. Ett basalvärde är utgångspunkten vid studier av stressvar. I vissa fall är djuren sina egna kontroller, men en annan grupp ”ostressade” hundar kan verka som kontroller. Stall för hemlösa hundar eller kennlar anses ej som stressfria miljöer (Bennett & Hayssen, 2010).

Om en redan stressad individ används för att studera svar på ett akut stresstimuli kan man få ett inkorrekt resultat. De redan förhöjda kortisolvärdena dämpar till viss del kortisolfrisättningen genom negativ feedback på HPA-axeln samt ger en förändring i mängden receptorer (Kirschbaum & Hellhammer, 1989; Beerda et al, 1999).

### **Icke-invasiva provtagningsmetoder för kortisol**

Forskning kring icke-invasiva provtagningsmetoder ökar. Inom stressforskning är efterfrågan på alternativ till blodprovstagning stor vilket reflekteras i det stora antalet artiklar som publicerats i ämnet.

#### **Saliv**

I djurväl-färds- och stresstudier blir salivkortisolkoncentrationen en alltmer använd stressindikator (Dreschel & Granger, 2009). Många studier visar att provtagning av saliv är en pålitlig metod som väl reflekterar kortisolvärdena i plasma (Kirschbaum & Hellhammer, 1989).

Obundet kortisol diffunderar passivt från blodet till spottkörtlarna och ut i saliven. Denna egenskap hos hormonet har gett upphov till diskussion kring huruvida kortisolkoncentrationen i saliv påverkas av salivflödet. Man har sett att salivkortisolkoncentrationen liknar den fria kortisolfraktionen i blodet motsvarande cirka 5-12 % av totala blodkoncentrationen hos hund och människa (Beerda et al, 1996; Vincent & Michell, 1992; Kirschbaum & Hellhammer, 1989).

#### **Akut stress**

Överrensstämmelse mellan saliv- och plasmakortisol svar har setts i flera akuta stresstudier på hund. Bland annat när man genom insulinadministration orsakade hypoglykemisk stress (Beerda et al, 1996), när man injicerade syntetiskt ACTH samt vid exponering av ett stressande ljud (Vincent & Michell, 1992). Det sistnämnda försöket innefattade dock endast en individ. En större relativ ökning i saliv än i plasma jämfört med basala koncentrationer sågs i Vincent och Michells (1992) försök. De förklarar detta med att den fria fraktionen i blod ökar relativt till den bundna fraktionen medan saliv endast reflekterar den fria fraktionen i plasma. De märkte även en viss fördröjning mellan ökningen av kortisol i saliv jämfört med plasma vilket Beerda et al (1996) inte såg. Kirschbaum och Hellhammer (1989) anser inte att tidsskillnaden är betydande då man sett en topp i salivkoncentration någon minut efter maximal plasmakoncentration vid administration av exogent kortisol i blodet på män, dock bara två personer. Kobelt et al (2003) såg ingen effekt av hanteringen på kortisolkoncentrationen i saliv på upp till fyra minuter vilket ger god marginal då de menar att provtagning som mest tar en minut. Jämförelsevis har man sett en hanteringseffekt i plasma efter tre minuter vilket innebär att man har två minuter på sig att ta ett blodprov för kortisolanalys (Kobelt et al, 2003; Queyras & Carosi, 2004).

Höga plasmakortisolnivåer varar oftast inte längre än 90 minuter. Salivprov kan tas relativt frekvent varav studier av akut stress blir möjliga då man kan uppfatta snabba förändringar (Queyras & Carosi, 2004).

### *Kronisk stress*

Medan Kirschbaum och Hellhammer (1989) skriver att inga tillgängliga data på att salivkortisol reflekterar kronisk stress finns anser Beerda et al (1999), tio år senare, att salivkortisol är ett användbart verktyg för att upptäcka även kronisk stress och därmed dålig djurvälstånd. De såg ökade salivkortisolkoncentrationer på hundar efter fem veckors begränsning socialt och spatialt.

### *Variation*

Flera studier har visat stor variation i salivkortisolkoncentrationen inom- samt mellan individer. Man bör därför ta ett flertal prover under flera dagar för att fastställa basalnivå. För att få bra resultat bör även samma provtagningsmetod användas vilket man kan säkerställa genom planering och instruktion (Dreschel & Granger, 2009; Kobelt et al, 2003). Exempel på uppmätta basala salivkortisolkoncentrationer kan ses i Tabell 1.

*Tabell 1. Olika studiers uppmätta medelvärden av basala salivkortisolkoncentrationer*

Källa	Kontroll		Basal medelkoncentration (µg/dl)
	Antal hundar	Situations beskrivning	
Vincent & Michell, 1992	6	Försökshundar, Beaglar, kullsyskon Tuggade på bomullstopp	0.19 ± 0.03
Beerda et al, 1999	15	Försökshundar, Beaglar med utevistelse Roterade bomullstopp i kinden	0.08 ± 0.01
Kobelt et al, 2003	6	Renrasiga Kelpies Citronsyra samt roterande bomullstopp under tungan och i kinden	0.15
Dreschel & Granger, 2009	6	Privatägda, olika kön, ålder och raser ”Cotton dental rope” hölls inuti hundens mun	0.17 ± 0.06
Bennett & Hayssen, 2010	45	Privatägda, olika kön, ålder och raser Svabbade med ett ”Cotton rope” inuti hundens mun	0.16 ± 0.06

### *Provtagning*

Salivprovtagning kräver liksom blodprovstagning viss hantering av djuret vilket man i försök minimerat när hundar fått lukta på en stängd hand med godis. De flesta hundar medverkade då

frivilligt varav salivprovet gick snabbare att ta. De behövde inte heller använda salivstimulerare som exempelvis citronsyra (Bennet & Hayssen, 2010).

Salivprov kan tas genom att hundar slickar/tuggar på en bomullstopp (Vincent & Michell, 1992), vilket i sig stimulerar salivflödet. Kortisol verkar inte fästa till bomull som därför ej påverkar resultatet enligt Kirschbaum och Hellhammer (1989). Harmon et al (2007) skriver däremot att vid låg provvolym riskerar kortisolet att stanna i ett bomullsbaseerat provtagningsmaterial följt av ett felaktigt för lågt analysresultat. En ”ögonsvabb av hydrocellulosa” visade sig användbar för salivuppsamling på hund (Dreschel & Granger, 2009) men även på människa (Harmon et al, 2007). Redskapet fördrogs av personalen då hundarna kunde stänga munnen, den rymdes mellan tänder, gick möjligen snabbare än bomullsredskap och påverkade inte provresultatet vid låg provvolym. Det var dock osäkert om tillräcklig volym för analys erhöles (Dreschel & Granger, 2009).

Bra analysmetoder klarar idag att analysera kortisol från 25 µl saliv. Även denna lilla volym kan dock bli svårt att uppnå på en liten, svårhanterad eller dehydrerad hund. Antalet test samt möjligheten att duplicera ett prov begränsas av volymen. Man har emellertid sett att i princip vem som helst med lite träning lätt kan erhålla tillräcklig provvolym, även från en uppspelt hund (Dreschel & Granger, 2009; Harmon et al, 2007).

Ibland tas salivprov med smakförsatt material. I en studie ansåg man att användande av provtagningsmaterial med biffsmak var ovisst då det gav felaktigt högre kortisolkoncentration *in vitro*. Matpartiklar innehållandes substanser som korsreagerar med antikropparna använda i kortisolanalysen kan kontaminera ett salivprov och ge felaktigt provresultat (Dreschel & Granger, 2009).

Salivstimulerare, såsom citronsyra har vid en koncentration på endast 0,1 mg/l *in vitro* gett pH sänkning och vidare felaktigt högre salivkortisolkoncentration vid analys. Hundens saliv verkar dock ha en buffrande förmåga. Ingen signifikant skillnad i saliv-pH sågs *in vivo*. Hundarna i försöket gillade dock inte att utsättas för citronsyra och ingen skillnad fanns i uppsamlad volym saliv, eventuellt för att hundarna gjorde motstånd (Dreschel & Granger, 2009).

## **Urin**

Mängden kortisol i urin relateras till mängden kreatinin, den så kallade kortisol:kreatinin kvoten (K:K). Detta görs för att korrigera för njurarnas filtration (Rijnberk & Kooistra, 2010).

## **Akut stress**

Hos tolv hundar som bland annat gavs exogent ACTH såg man ett positivt linjärt samband mellan koncentrationen av kortisol i plasma och K:K kvoten. Minskad kortisolfrisättning speglades inte i urinen (Jones et al, 1990). Beerda et al (1996) fick ökad mängd kortisol i urinen efter framkallad stress i form av hypoglykemi efter insulinadministration. De fann ingen korrelation mellan urin- och plasmakortisolkoncentrationen före försöket.

Enligt Schatz och Palme (2001) tar det cirka tre timmar att nå maximal kortisolkoncentration i urinen efter ett stresstimuli skett. Detta stämmer överens med Queyras och Carosi (2004) som skriver att tiden mellan en topp i plasmakortisolkoncentrationen vid stress tills ett svar syns i urinen, oftast är mindre än fem timmar.

### ***Kronisk stress***

Hos fyra grupper av hundar vilka länge levt i olika förhållanden graderade ett till fyra (ett ansågs bäst och fyra värst) såg man att K:K kvoten steg från ett till fyra som förväntat. Detta visade att de med värst levnadsförhållanden var mest utsatta för kronisk stress. HPA-axelns tillvänjning vid kronisk stress verkade inte kunna återställa kortisol till basal nivå hos de hundar som levt under dåliga förhållanden länge (Beerda et al, 2000).

### ***Variation***

Man har sett att K:K kvoten varierar mycket inom- samt mellan individer men ej vid någon speciell tidpunkt på dagen (Jones et al, 1990). Se Tabell 2 för uppmätta basala K:K kvoter i olika studier.

*Tabell 2. Olika studiers uppmätta basala K:K kvoter hos friska hundar*

Källa	Kontroll		Basal K:K kvot
	Antal hundar	Situations beskrivning	
Beerda et al, 1996	16	Olika åldrar, kön och raser Hölls individuellt, viss utevistelse Icke extraherat prov Spontankastad urin	$6.2 \times 10^{-6}$
Jones et al, 1990	12	Vuxna hundar, olika kön Rastades utomhus Icke extraherat prov Spontankastad urin	$9.4 \times 10^{-6}$
Beerda et al, 2000	24	Privatägda hundar, olika raser och kön. Motsvarar hundarna med bäst levnadsförhållanden i studien, det vill säga grupp 1 av 4.	$4.8 \times 10^{-6}$

### ***Faeces***

Olika djurarter utsöndrar olika kortisolmetaboliter i faeces vilket kan bero på arternas olika metabolism samt skillnader i tarmens bakterieflora som vidare metaboliserar metaboliterna. Endast små mängder ometaboliserat kortisol hittades i faeces i försök på hund och katt (Schatz & Palme, 2001).

### *Akut & kronisk stress*

Både aktivering och hämning av kortisolfrisättningen har reflekterats väl vid mätning av kortisolmetabolitkoncentrationen i faeces. Utveckling av analyser som detekterar de speciesspecifika metaboliterna skulle förbättra tillämpningen ytterligare (Schatz & Palme, 2001).

Snabba kortisolkoncentrationsvariationer, som vid akut stress, går inte att läsa lika bra i faeces som i blod, saliv och möjligen urin då det går relativt lång tid mellan frisättning till blod och utsöndring i faeces (Schatz & Palme, 2001). Kortisolmetabolitkoncentrationen i faeces verkar väl spegla totala mängden producerad kortisol motsvarande tiden för tarmpassage. Kortisolproduktion under en längre tid kan inte avläsas i ett prov från blod där kortisolkoncentrationen ändras snabbt (Möstli & Palme, 2002).

Fördröjningen från en kortisoltopp i plasma till motsvarande i faeces speglar den artspecifika tiden för tarmpassage. Man har i försök sett mindre toppar i faeces samt förlängd tillbakagång efter maxkoncentration vilket kan bero på att kortisol recirkulerar i det enterohepatiska kretsloppet eller på grund av uppblandning i tarmen (Schatz & Palme, 2001)

### *Variation*

Stor variation av kortisolmetaboliter i faeces har setts mellan individer. Vid användning av faecesprov bör djuret därför fungera som sin egen kontroll efter att man fastställt en basalnivå (Schatz & Palme, 2001). Matintaget kan påverka och ge variation (Möstli & Palme, 2002). Förhållandet mellan faeceskortisolnivåer till plasmakortisol kan även skilja sig åt mellan defekationer och fler faecesprov bör därför tas för att provet ska anses representativt (Queyras & Carosi, 2004).

## **DISKUSSION**

I djurvälståndssammanhang är upptäckt av stress mycket viktigt. Kroniskt stressade individer löper många risker såsom infektioner och tillväxthämning. Kunskap om tillfälliga, akut stressande situationer är också viktigt för att främja djurs välmående. Provtagningsmetoder, med så minimal hantering av djuret som möjligt, är av stor vikt. Det är mindre risk att icke-invasiva provtagningsmetoder utgör en stressfaktor som ger ett opålitligt provresultat. Blodprovstagning är ofta stressande för djuret, förenat med viss infektionsrisk, behöver utföras av tränad och utbildad personal samt är eventuellt etiskt diskuterbar.

Kortisol är ett komplext verkande hormon med invecklad reglering. Mycket tyder på en mindre uttalad dygnsvariation i kortisolfrisättning hos hund än hos människor (Sjaastad et al, 2010; Feldman & Nelson, 2004; Rijnberk & Kooistra, 2010; Torrance & Mooney, 1998). Många faktorer påverkar kortisolfrisättningen såsom födointag och aktivitet. Mycket skulle därför kunna överskugga en eventuell rytm. Det är inte helt lätt att avgöra vad som för tillfället ger ökad kortisolkoncentration hos hunden, vilket kan göra kortisolnivåer svårtolkade i samband med akut stress.



Studier inom alla berörda provtagningsmetoder har fått stora variationer i kortisolkoncentration både inom- och mellan individer (Dreschel & Granger, 2009; Kobelt et al, 2003; Jones et al, 1990; Schatz & Palme, 2002), en förklaring till varför normala kortisolvärden faller inom ett brett spann (Feldman & Nelson, 2004). Man bör därför utgå från ett basalvärde, fastställt genom upprepade provtagningar, när man tolkar en eventuell kortisolkoncentrationsökning i samband med både akut- och kronisk stress. Önskvärt är om individen kan fungera som sin egen kontroll (Dreschel & Granger, 2009; Kobelt et al, 2003; Queyras & Carosi, 2004; Reimers et al, 1990).

Icke patologiska faktorer som ålder, ras och eventuellt kön, kan påverka kortisolfrisättningen och göra jämförelsen mellan en individs kortisolvärden och fastställda referensvärden svår (Reimers et al, 1990; Reul et al, 1991; Beerda et al, 1999). Det är oklart huruvida dessa påverkar kortisol i samband med stress. Även fysisk aktivitet med mera kan variera inom- och mellan individer. Faktorer som ger variation i kortisolkoncentrationen i samband med stress är hundens karakteristika (Hydbring-Sandberg et al, 2004), dess tidigare erfarenheter och vanor (Beerda et al, 1999) samt situationen, alltså vilken typ av stresstimuli djuret utsätts för (Kirschbaum & Hellhammer, 1989).

Variationer mellan försök och mellan djurpopulationer kan vidare bero på olika provtagnings tekniker, provtagningsfrekvenser och analysmetoder (Kirschbaum & Hellhammer, 1989; Jones et al, 1990). Olika antiserum kan korsreagera med kortisolliknande strukturer i provet och ge varierande värden och analys kan ske av olika metaboliter i faeces- och urinprov. Detta gör jämförelse mellan laboratorier svårt. Det finns kommersiella kvalitetskontrollprov för plasma-/serumprov. Laboratorier kan därmed kalibrera sin analysmetod vilket gör jämförelser mindre osäkra till skillnad från exempelvis salivprov där sådant referensmaterial saknas (Kirschbaum & Hellhammer, 1989).

Bland annat fysiologisk anpassning vid stress gör att ett oförändrat kortisolvärde inte kan utesluta förekomst av stress. Ett förhöjt kortisolvärde är dock en god indikation på stress, speciellt vid komplettering av andra stressindikatorer som ändrat beteende och ökad hjärtfrekvens (Beerda et al, 1999; Vincent & Michell, 1992). Tillämpning av beteende som ensam stressindikator är svårt. Avvikande beteendet existerar inte alltid, är högst individuellt och varierar efter typ av stresstimuli. Även ökad hjärtfrekvens innebär svårigheter i sammanhanget på grund av ospecifik variation (Beerda et al, 1996; Beerda et al, 1998; Beerda et al, 1999; Beerda et al, 2000). Att kombinera flera stressindikatorer är av stort värde vid utredning av stress utanför försöksmiljön, hos exempelvis kennelhundar, där man inte har ett basalvärde som utgångspunkt.

Saliv ger ett bra mått på den biologiskt aktiva kortisolfraktionen (Beerda et al, 1996; Vincent & Michell, 1992; Kirschbaum & Hellhammer, 1989). Metoden utgör därför ett bra alternativ till blodprovstagning. Vid ett akut stressvar ökar kortisolkoncentrationen snabbt i blodet då de hormonproducerande cellerna ej har förmåga till lagring (Rijnberk & Kooistra, 2010). Detta reflekteras väl i saliven på hund (Beerda et al, 1996; Vincent & Michell, 1992) och är lätt att detektera då salivprov kan tas relativt frekvent (Queyras & Carosi, 2004) till skillnad från

urin- och faecesprov där man inte kan påverka provtagningstiden om man vill ha spontankastat prov. Provtagningsfrekvensen är alltså avgörande för hur informativ bild man får. I princip vem som helst kan ta ett salivprov (Dreschel & Granger, 2009).

Hantering vid salivprovtagning går att minska med olika knep (Bennett & Hayssen, 2010). Då man sett en fördröjningseffekt på några minuter, längre än vad man sett i plasma, har man god chans att hinna ta ett salivprov som inte påverkas om individen blir stressad (Kobelt et al, 2003; Queyras & Carosi, 2004). Det är dock delade meningar om en fördröjningseffekt existerar (Vincent & Michell, 1992; Beerda et al, 1996) varför man inte kan utesluta en påverkan från hanteringen. Olika resultat av en fördröjningseffekt kan som nämnts bero på provtagningsfrekvens. Man bör akta sig för antagandet att salivprovtagning, som kräver viss hantering, alltid är mindre stressande än blodprovstagning. Blodprovstagning kan likaväl upplevas mindre stressande hos vissa individer och därmed gå snabbare att ta.

Man bör ha i åtanke att analys av salivkortisolkoncentrationen kan påverkas av flera faktorer såsom provtagningsmaterial och provvolym, matkontaminanter samt salivstimulantia (Harmon et al, 2007; Dreschel & Granger, 2009). Salivflödets påverkan på salivkortisolkoncentrationen bör klarläggas ytterligare då många faktorer förutom passiv diffundering spelar in. Salivkortisol kan eventuellt användas som indikator på kronisk stress (Beerda et al, 1999) men detta anser jag kräver mer utredning då mycket kan bidra till en ökad kortisolfrisättning.

K:K kvoten i urin reflekterar kortisolfrisättningen över en viss tid snarare än en momentan höjning som bättre reflekteras i blod och saliv. Detta kan förklara varför Beerda et al (1996) inte fick någon korrelation mellan urin- och plasmakortisolkoncentrationen. Kortisol mätt i urinen kan därmed vara en god indikator för kronisk stress och man har bland annat sett en gradvis ökning hos hundar med allt sämre levnadsförhållanden (Beerda et al, 2000). Minskad kortisolfrisättning visade sig inte i urinen vilket tyder på att K:K kvoten ej kan användas för att detektera en minskad frisättning. Reabsorption i proximala tubuli, samt utförandet av experimentet kan vara förklarande faktorer till resultatet (Jones et al, 1990).

Urin har även visat sig användbar för att mäta ett akut stressvar (Jones et al, 1990; Beerda et al, 1996) då tiden mellan utsöndring till blod och svar i urinen är relativt kort, dock avsevärt längre än svaret i saliv (Schatz & Palme, 2001; Queyras & Carosi, 2004). Att samla urinprov från hund kräver minimal hantering och är relativt lätt jämfört med katt som kan spraya urinen.

Kortisolmetaboliter mätt i faeces speglar väl den totala mängden producerad kortisol under en viss tid vilket man bland annat sett vid hämning och stimulering av kortisolfrisättningen (Möstli & Palme, 2002; Schatz & Palme, 2001). Metoden kan därmed vara bra för att mäta kronisk stress på hund. Ett akut stressvar speglas med största sannolikhet inte i faeces på grund av tiden för tarmpassage och uppblandning i tarmen. Ett faecesprov är lätt att ta och kräver ingen djurhantering.

Påverkande faktorer att tänka på i samband med kortisolanalys i faeces är djurartspecifika kortisolmetaboliter, tid för tarmpassage, eventuell påverkan från matintag, recirkulation i enterohepatiska kretsloppet samt variation mellan individer och defekationer (Schatz & Palme, 2001; Queyras & Carosi, 2004, Möstli & Palme, 2002)

## Slutsats

Jag anser att alla berörda provtagningsmetoder har god potential som icke-invasiva alternativ till blodprovstagning i samband med stressutredning på hund. Akut- respektive kronisk stress reflekteras olika väl med olika provtagningsmetoder vilket man bör ha i beaktande liksom att olika djurarter utsöndrar specifika metaboliter huvudsakligen via en exkretionsväg som för hund är urinen (Rijnberk & Kooistra, 2010). Stor variation inom- samt mellan individer kan göra ett kortisolvärde svårtolkat (Dreschel & Granger, 2009; Kobelt et al, 2003; Jones et al, 1990; Schatz & Palme, 2002). Det finns dock flera strategier för att få stressbedömningen avseende kortisol så tillförlitlig som möjligt. Queyras & Carosi (2004) sammanfattar väl stressbedömningens komplexitet: "Overall, assessing stress is rather complex, in that it entails objectively quantifying stress, distinguishing between causes and effects and between psychological and physiological stress, understanding how a given species adapts to a stressful situation and how its living environment affects the reproductive and endocrinological measures of stress, and assessing inter- individual variability in response to stressful stimuli."

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Janssen, N.S.C.R.M. & Mol, J.A. (1996). The Use of Saliva Cortisol, Urinary Cortisol, and Catecholamine Measurements for a Noninvasive Assessment of Stress Responses in Dogs. *Hormones and Behavior*, vol. 30, ss. 272-279.
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, J.A.R.A.M., de Vries, H.W. & Mol, J.A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 58, ss. 365-381.
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Bernadina, W., van Hoof, J.A.R.A.M., de Vries, H.W. & Mol, J.A. (1999). Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. II. Hormonal and Immunological Responses. *Physiology & Behaviour*, vol. 66, no. 2, ss. 243-254.
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., van Hooff, J.A.R.A.M., de Vries, H.W. & Mol, J.A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*, vol. 9, ss. 49-62.
- Bennett, A. & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 39, ss. 171-180.
- Dreschel, N.A. & Granger, D.A. (2009). Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior*, vol. 55, ss. 163-168.
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3. ed. St. Louis: Saunders

- Harmon, A.G., Hibel, L.C., Rumentseva, O. & Granger, D.A. (2007). Measuring Salivary Cortisol in Studies of Child Development: Watch Out – What Goes in May Not Come Out of Saliva Collection Devices. *Developmental Psychobiology*, vol. 49, ss. 495-500.
- Harvey, R.A. & Ferrier, D.R. (2011). *Biochemistry*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hydbring-Sandberg, E., von Walter, L.W., Höglund, K., Svartberg, K., Swenson, L. & Forkman, B. (2004). Physiological reactions to fear provocation in dogs. *Journal of Endocrinology*, vol. 180, ss. 439-448.
- Jones, C.A., Refsal, K.R., Lippert, A.C., Nachreiner, R.F. & Schwacha, M.M. (1990). Changes in adrenal cortisol secretion as reflected in the urinary cortisol/creatinine ration in dogs. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 7 (4), ss. 559-572.
- Kirschbaum, C. & Hellhammer, D.H. (1989). Salivary Cortisol in Psychobiological Research: An Overview. *Neuropsychobiology*, vol. 22, ss. 150-169.
- Kobelt, A.J., Hemsworth, P.H., Barnett, J.L. & Butler, K.L. (2003). Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science*, vol. 75, ss. 157-161.
- Möstli, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 23, ss. 67-74.
- Queyras, A. & Carosi, M. (2004). Non-invasive techniques for analysing hormonal indicators of stress. *Ann Ist Super Sanità*, vol. 40, ss. 211-221.
- Reimers, T.J., Lawler, D.F., Sutaria, P.M., Correa, M.T. & Erb H.N. (1990). Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 51, no. 3, ss. 454-457.
- Reul, J.M.H.M., Rothuizen, J. & de Kloet, E.R. (1991). Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 40, no. 1-3, ss. 63-99.
- Rijnberk, A. & Kooistra, H.S. (2010). Adrenals. I: S. Galac., C.E. Reusch., H.S. Kooistra, & A. Rijnberk, (red), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. 2. ed, reviderad och utökad. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., kap. 4 & 12.
- Schatz, S. & Palme, R. (2001). Measurement of Faecal Cortisol Metabolites in Cats and Dogs: A Non-invasive Method for Evaluating Adrenocortical Function. *Veterinary Research Communications*, vol. 25, ss. 271-287.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, ss. 244-249, 251-252.
- Tizard, I.R. (2009). *Veterinary immunology*. 8. ed. St. Louis: Saunders, ss. 481.
- Torrance, A.G. & Mooney, C.T. (1998). Collection, Storage and Transport of Samples for Hormone Assay. I: R.F. Nachreiner, & K.R. Refsal, eds. *Manual of Small Animal Endocrinology*. 2. ed. Shurdington: British Small Animal Veterinary Association, kap 33.
- Vincent, I.C. & Michell, A.R. (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science*, vol. 53 (issue 3), ss. 342-345.

